

論文の内容の要旨

論文題目 OATP1B1 を介した薬物間相互作用の適正評価に向けた前臨床
プローブ基質の最適化ならびに新規蛍光阻害評価系の構築

氏名 和泉 沙希（戸籍名：相良 沙希）

【序論】

Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 (OATP1B1) はヒト肝細胞の血管側膜に発現し、高脂血症治療薬などアニオン性薬物の肝初回通過効果ならびに循環血からのクリアランスに関与し、基質薬の血中動態の決定要因となる。OATP1B1 を介した臨床薬物間相互作用 (DDI) の事例が数多く報告されており、阻害薬併用による OATP1B1 基質薬の血中濃度上昇は、副作用発症リスクを高め、特に安全域が狭い基質薬の場合は重篤な副作用につながり得る。このような背景を受け、近年、日米欧の規制当局から薬物相互作用に関する (ドラフト) ガイダンス・ガイドラインが発出され、医薬品候補化合物の OATP1B1 阻害リスク評価に対する決定樹が定められた。リスク評価には医薬品候補化合物の OATP1B1 に対する阻害定数 (K_i) が必要であるため、信頼性の高いリスク評価には K_i 値を非臨床試験で正しく見積もることが大切である。

OATP1B1 阻害試験では、一般に OATP1B1 遺伝子を強制発現させた哺乳動物由来細胞を用い、プローブ基質の取り込みに対する被験物質の阻害作用を検討する。本評価系は広く創薬現場で用いられているが、二つの課題を有していた。一つ目の課題は OATP1B1 が基質依存的な阻害を示すことである。これは、阻害試験に用いる基質の選択によっては被験物質の OATP1B1 に対する阻害活性を過小評価し、DDI リスクを見逃し得ることを示唆する。二つ目の課題はスループット性の低さであり、創薬初期に問題となっていた。そこで本研究では、OATP1B1 の基質依存的な阻害を網羅的に検証し、阻害試験に最適なプローブ基質を見出すとともに、スループット性向上を目的に蛍光法に基づく新規 OATP1B1 阻害評価系を構築することで、創薬への貢献を目指した。

【本論】

1. 臨床基質薬を用いた OATP1B1 の基質依存的な阻害の検討

OATP1B1 の基質依存的な阻害を網羅的に検討するため、臨床で OATP を阻害する cyclosporine A (CsA)、rifampin (RIF)、gemfibrozil (GEM) 及びそのグルクロン酸抱合体 (GEM-glu) の阻害活性を 12 種類の OATP1B1 臨床基質薬を用いて検討した。CsA、RIF、GEM 及び GEM-glu の OATP1B1 に対する K_i 値は、基質間でそれぞれ 6.3、3.4、26 及び 15 倍の乖離を示し、OATP1B1 の基質依存的阻害を明らかとした。OATP1B1 を介する DDI リスクの過

小評価の回避には、より鋭敏に阻害活性を検出できるプローブ基質を使用すべきであると考えられた。

2. OATP1B1 阻害試験に適した RI プローブ基質の選定

放射性同位元素 (RI) 標識基質を用いた阻害評価系は高感度で定量が簡便なため、当局申請を目的とした試験で通常用いられるが、OATP1B1 に関する基質依存的な阻害の検討はなされてこなかった。そこで、OATP1B1 の典型的基質である^[3H]estradiol-17β-glucuronide (E₂G)、^[3H]estrone-3-sulfate (E₁S) 及び^[3H]sulfobromophthalein (BSP) を用いて、14 化合物の K_i 値を算出し、これら 3 種類の RI プローブ基質が OATP1B1 の阻害活性を鋭敏に検出できるか検討した。

その結果、顕著な基質依存的阻害が観察され、ritonavir、GEM 及び erythromycin の K_i 値は基質間でそれぞれ 117、14 及び 13 倍の差が認められた。また、臨床で OATP を阻害する RIF 及び CsA の K_i 値もそれぞれ 12 及び 6 倍の乖離を示した。3 種類の RI プローブ基質のうち、^[3H]E₂G は検討した全ての被験物質の阻害活性を最も鋭敏に検出することができ、さらに^[3H]E₂G を用いて得られた CsA、RIF、GEM 及び GEM-glu の K_i 値は、OATP 基質薬を用いて得られた K_i 値と同等であった。一方、^[3H]E₁S 及び^[3H]BSP を用いて得られた K_i 値は、^[3H]E₂G あるいは臨床基質薬から得られた K_i 値よりも大きい傾向が認められた。^[3H]E₁S は OATP1B1 による輸送活性の高さから *in vitro* 阻害試験で RI プローブ基質として使用されることが多いが、本知見により DDI リスクを過小評価する可能性が示唆された。

続いて、規制当局が定めた決定樹に従い、CsA、RIF、GEM 及び GEM-glu による DDI リスクを評価した。臨床で強力に OATP を阻害する CsA や RIF に対しては、いずれの基質を用いても DDI リスクを検出できたが、GEM 及び GEM-glu のように弱～中程度の阻害剤の場合、*in vitro* 阻害試験で用いる基質の選択が臨床 DDI 試験要否の判断に影響することが明らかとなった。^[3H]E₂G は全ての阻害剤に対して DDI リスクを検出できたが、^[3H]E₁S 及び^[3H]BSP は GEM 及び GEM-glu による DDI リスクを検出できなかった。即ち、^[3H]E₂G は基質依存的阻害に起因する DDI リスクの過小評価を回避する上で有用な RI プローブ基質であると言える。

さらに、OATP1B1 の基質依存的阻害メカニズムの解明のため、3 基質間の相互阻害様式を検討した。本検討結果から、少なくとも OATP1B1 による 3 基質の取り込みは単一の結合部位を介した輸送では説明できず、OATP1B1 上に複数の基質結合部位が存在し、これが基質依存的な阻害作用の要因であることが推察された。

3. 新規 OATP1B1 蛍光基質の探索と、蛍光法に基づく阻害評価系の構築ならびに運用

蛍光法は高感度でスループット性に優れており、創薬初期の多検体評価で有用である。しかし、既知の OATP1B1 蛍光基質のうち一般試薬として購入できるものは限られており、購入可能なものについても検出感度、取扱い時の安全性、ランニングコストの面で課題があり、必ずしも創薬ニーズを満たしていなかった。そこで、OATP1B1 蛍光基質の満たすべき条件として、

①OATP1B1 の良好な基質であり、良好な検出感度が得られること、② $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ と同等の K_i 値を与えること、③安価であること、を設定した。

これらの条件を満たし得る蛍光基質として、pH 7.4 で負電荷を帯び、かつ高い蛍光量子収率を有する fluorescein (FL) 誘導体に着目した。複数の FL 誘導体の OATP1B1 を介する取り込みを検討した結果、oregon green (OG)、2',7'-dichlorofluorescein (DCF) 及び 4',5'-dibromofluorescein (DBF) の3つを新規 OATP1B1 蛍光基質として見出した。これら新規蛍光基質の OATP1B1 を介した取り込み活性は既知の蛍光基質を上回り、特に DCF は最も高い輸送活性を示した。

OATP1B1 蛍光基質を用いて 6 阻害剤の K_i 値を検討した結果、いずれの蛍光基質も $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ と同等の K_i 値を与え、DDI リスクを鋭敏に検出できることがわかった。そこで、OATP1B1 を介した取り込み活性、検出感度、及びランニングコストの面で優れている DCF を蛍光プローブ基質として選出し、さらに多くの阻害剤の K_i 値を算出した。DCF と $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ を基質として得られた K_i 値の間に良好な 1:1 の相関があり、かつ DCF は臨床での DDI リスクを $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ と同等に検出することが可能であった。また、 E_2G と DCF の相互阻害作用を検討した結果、両基質は互いに競合阻害し、それぞれの K_m 値と K_i 値がほぼ一致していることから、同一の結合部位を介して輸送されることが示唆された。即ち、DCF は DDI リスク評価の観点で $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ と等価なプローブ基質であると言える。

本研究において見出した DCF を用い、蛍光法に基づく新規 OATP1B1 阻害評価系を構築し創薬プロジェクトに活用した。蛍光法を用いることでスループット性が向上し、合成展開に有益な構造活性相関の情報をよりタイムリーにプロジェクトチームに提供可能となった。

【結論】

本研究により、OATP1B1 は顕著な基質依存的な阻害を示すこと、さらに $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ は DDI リスクを見逃さない理想的な RI プローブ基質であることを明らかにした。本知見は OATP1B1 を介した DDI リスクを前臨床試験で適正に評価する上で有用であり、厚生労働省より発出された薬物相互作用ガイドライン最終案では、本研究を端緒として OATP1B1 阻害試験のプローブ基質は $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ よりも $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ が望ましいと明記されている。

複数の FL 誘導体の OATP1B1 に対する基質性を検討し、DCF、OG 及び DBF を新規 OATP1B1 蛍光基質として見出した。中でも DCF は OATP1B1 の最も良好な基質であり、 $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ と同様に DDI リスクの過小評価を回避できることから、DCF を用いた新規蛍光阻害評価系を構築した。本評価系は従来法に比べてスループット性が高く、特に創薬初期のスクリーニング評価において有用なツールとして活用されている、さらに今後 DCF を用いた蛍光法も当局申請を目的とした試験に普及すると考えられる。本研究により非臨床における OATP1B1 を介した DDI リスクの適正評価が推進され、より安全な医薬品の創出に貢献するものと期待される。